蝌蚪（*Bufo bufo andrewsi*）血红细胞微核和核异常监测水质污染的研究*

贺维顺　王蕊芳
（中国科学院昆明动物研究所遗传与进化实验室）

关键词：水质污染，蝌蚪，微核试验，核异常

滇池是云南高原最大的淡水湖，是昆明地区工农业生产及人民生活用水的水源，又是昆明市的重要风景区。近年来，滇池水质污染，越来越引起人们的关注。昆明市的工业废水和生活污水经大观河等流入滇池，其中有毒有害物质多达30多种，包括镉、汞、砷、铅、铬、氟、有机磷、氰化物等。其中砷（Léonard *et al*., 1980；Katsuhiko, *et al*.,1981；贺维顺等,1988），铅（刘明韬等，1983；黄旭培等，1984），铬（Léonard 1980；Nakamuro *et al*., Wild, 1978；贺维顺等，1987），氟（贺维顺等，1983），有机磷（贺维顺等，1982）等都是业经证实或可疑的致突变物。这些物质对人体健康的远期效应，尤其是潜在的致癌效应如何？是人们普遍关心的问题。利用蝌蚪血有核红细胞微核和核异常，来检测大观河污水的致突变性，以预测流入滇池的污染物对人体健康的潜在致癌性，是本工作的主要目的。

材料和方法

受检水样：

1.取水时间为1987年12月，枯水季节。

2.取水地点为昆明市大观路43医院对面的大观河桥下。

3.污水处理：收集待检水样25升，自然沉淀后待用。

4.对照水为昆明动物研究所生活饮用水，从315米地下断层中抽取。经卫生防疫站化验符合国家规定的饮用水标准。

实验动物：实验动物为华西大蟾蜍（*Bufo bufo andrewsi*）变态前的蝌蚪，捕于昆明市西郊花红洞附近的水塘。体重约0.4—0.5g。养在实验室符合饮水标准的水中。每日上午投入磨细的金鱼饵料一次，每周换水两次。

实验分组：

1.1／3的大观河污水组（33.3%污水加66.7%的饮用水）。

2.1／2的大观河污水组（50.0%污水加50.0%的饮用水）。

3.未经稀释的大观河污水组。

4.对照组（饮用水组）。

---

* 本文承施立明研究员审阅，特此致谢。

本文1988年8月8日收到，同年12月14日修回。

每组20只蝌蚪，分别放养在3升含有不同比例污水的养鱼缸中，染毒一周。

标本制备：蝌蚪染毒7天后，转移到符合饮水标准的水中，6小时后处死取血制片。

制片时使蝌蚪腹部向上，在双筒解剖镜下，用眼科剪将腹部皮肤剪开，露出心脏，取血加到预先滴有小牛血清的载玻片上，与小牛血清混匀后作涂片并立即用电吹风吹干，甲醇固定15分钟，10%的Giemsa（pH＝6.98）染色14—15分钟。

标本观察：蟾蜍蝌蚪血红细胞体积较大。经50个细胞测量结果其体积平均值为12187.98μm^3，核质比为9.88。红细胞的细胞质和细胞核形态清晰（见图版Ⅰ、Ⅱ）。观察指标为微核和各种类型的核异常。核异常的内容包括：微核（图版ⅠA）、核质外凸（图版ⅠB），核内凹（图版ⅠC），核固缩（图版ⅠD），核碎裂（图版ⅠE），核变形（图版F），核内空泡（图版ⅠG）和无丝分裂（图版ⅠH）。有关核异常的鉴别见薛开先（1987）及何海宴等（1986）的有关资料。微核及核异常观察的结果以千分数(‰)表示。

结果和讨论

不同浓度的大观河污水对蝌蚪红细胞微核率影响的结果：生活在饮水中的蝌蚪（对照组），红细胞的微核率为3.5‰。以不同浓度的大观河污水处理组染毒7天后，其微核率明显上升。33.3%污水处理组微核率为6.6‰，50.0%污水处理组微核率为8.6‰，污水处理组其微核率为12.2‰。有明显的剂量效应关系。经卡方（x^2）检验，与对照组相比，P>0.01，差异显著。

核异常是综合的核损伤指标。在实验中观察到的主要为微核，其次为核质外凸，核内凹，核固缩，核碎裂，核变形，核内空泡及无丝分裂等，总称核异常。

生活在饮水中的蝌蚪（对照组）核异常率为0.6‰。33.3%，50.0%及100.0%污水处理组，核异常率分别为1.6‰，2.2‰及3.6‰。随污水浓度的加大，核异常率也明显的升高，经统计学处理亦有显著性差异。我们的结果表明，微核指标更客观，灵敏度更高，与污染物的剂量效应关系更明显（见表1及图1）。

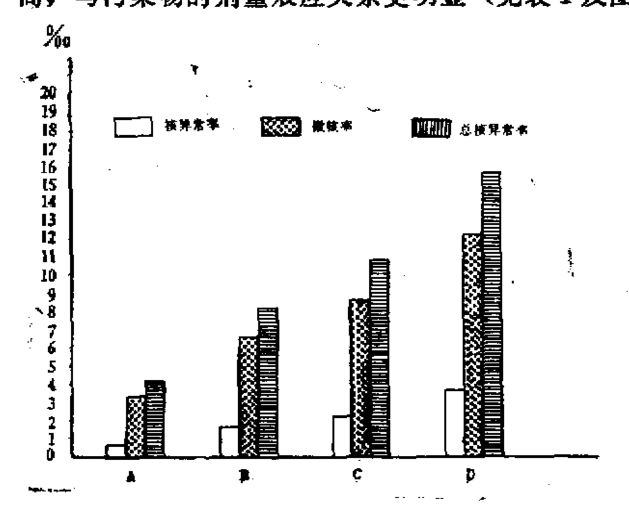


图1　不同浓度大观河污水诱发的蝌蚪（*Bufo bufo andrewsi*）红细胞微核和核异常比较

Fig. 1. Comparison of micronuclei and other nuclear anomalies in erythrocytes of tadpoles (*Bufo bufo andrewsi*), induced by exposure to polluted water at various concentration from Daguan River

A.对照组　B.33.3%污水组　C.50.0%污水组　D.100.0%污水组

表1　　大观河污水引起的蝌蚪（*Bufo bufo andrewsi*）血有核红细胞的微核和核异常

Table 1.　Micronuclei and other nuclear anomalies in erythroc ytes of tadpoles (*Bufo bufo andrewsi*) induced by exposure to polluted water of Daguan River

组　别 Groups	观察动物数（只） Number of animals	观察细胞数（个） Number of cells scored	微核和其它核异常 Micronuclei and other nuclear anomalies: 微　核 Micro-nucleus	核质外突 Nuclear protrusion	核内凹 Nuclear concavity	核碎裂 Karyorr-hexis	核空泡 Nuclear vacuole	核固缩 Karyop-yknosis	核变型 Irregular nucleus	无丝分裂 Amitosis	核异常率 Frequency of nuclear anomaly (‰)	微核率 Frequency of micronucleus (‰)	总核异常率 Total frequency of nuclear anomaly (‰)
对照组 Control	14	39239	137	13	4	1			1	3	0.6	3.5	4.1
33.3%污水组 Group of 33.3% polluted water	15	29032	192	20	6	4	6	2	3	5	1.6	6.6	8.2
50.0%污水组 Group of 50.0% polluted water	11	17815	154	24	1	3	5		2	4	2.2	8.6	10.8
100.0%污水组 Group of 100.0% polluted water	17	21277	259	32	12		9	11	5	7	3.6	12.2	15.8

微核试验是检查环境污染物对遗传物质—染色体损伤效应的一种简便、快速、有效的检测方法。目前，微核试验为一些国际组织如国际经济合作和发展组织（OECD），国际诱变剂，致癌剂防护委员会（ICPEMC）等推荐为检查致癌剂和诱变剂常用的遗传毒理学方法之一。

近年来，经流行病学调查证实，水体环境污染与人体肿瘤的发生密切相关（朱惠刚等，1984；苏德隆，1980）。因此，用水生脊椎动物微核试验作为指示器，检查水环境中的致突变物和致癌物的研究，已引起国内外学者的普遍重视（Buckley，1976；Hooftman *et al.*，1982；曹维勤等，1983；何海宴等，1984；刘爱华等，1985；Das，*et al.*，1986；Jaylet *et al.*，1986）。何海宴等（1984）用孔雀绿(Malachite green)来诱发泥鳅（*Misgurnus anguillicaudatus*）的核异常（微核），曹维勤等（1983）用城市混合污水诱发罗非鱼（*Tilapia*）的微核，Das 等（1986）用丝裂霉素 C（Mitomycin C）和东方造纸厂（印度奥立沙省）的废水，诱发印度鲶鱼（*Heteropneustes fossilis*）的微核。分别以 4 种不同浓度的污水染毒15天，1个月，2个月和3个月，其微核的平均值为0.46‰。最高剂量的丝裂霉素 C（阳性对照组）染毒后的微核率为1.44‰。从现有的结果来看，用鱼类的红细胞微核试验，作为水体污染物的报警系统灵敏度不够高。

微核率的高低，不仅取决于诱变剂或纺锤体抑制剂活性的强弱，还取决于细胞有丝分裂的速度。鱼类细胞微核率低，其原因之一可能是与外周血红细胞分裂指数低有关。蝌蚪在变态前幼体阶段细胞分裂旺盛。在常规的血涂片上，经常可以看到正在分裂的细胞（图版Ⅱ C）。看来用蝌蚪红细胞微核试验，检测水体中污染物，其灵敏度要比鱼类高得多。

Jaylet等（1986）通过有尾目肋螈（*Pleurodeles waltl*）幼体血红细胞微核观察，检测水中苯并[a]芘等四种化合物的致突变性，发现诱发的肋螈幼体红细胞微核率，随染毒剂量增大和时间的延长而显著增高。

Jaylet（1986）用乙基磺酸甲酯诱发肋螈幼体微核试验，并同 Hooftman（1982）的工作进行比较。Hooftman 用 40ppm 乙基磺酸甲酯处理东方荫鱼（*Umbra pygmae*）6周，产生微核的细胞仅有 5 ± 2‰。而用50ppm，乙基磺酸甲酯，以相同的方法处理肋螈幼体，有微核的细胞率达到85‰，在100ppm时其微核率到达200‰。

我们用无尾两栖动物蝌蚪微核试验的结果，同 Jaylet 等人用有尾两栖动物肋螈幼体研究的结果相一致。

存在于水体中的污染物，其特点是种类多，浓度低。利用水生脊椎动物直接检测水体中低浓度的污染物，必须采用高灵敏度的指标。蝌蚪红细胞微核试验，可能是检测水体中低浓度污染物比较理想的，有实用价值的生物指示器。此外，以蝌蚪为实验动物作微核测定还有其特有的优点：1.蝌蚪分布广，数量多，捕捉方便，费用低，易于实验室饲养管理。2.蝌蚪红细胞较大，细胞分裂旺盛，对污染物的灵敏度高。3.蝌蚪体内具有转化前诱变剂或前致癌剂为具有活性成份的微粒体活化系统（贺维顺等，1987）。4.微核标本制片方法简便，易于掌握，指标客观，取得结果快，便于推广应用。5.蝌蚪微核试验，不仅能检测水中单因子致突变效应，而且更适合检测污水中混合污染物的联合致突

变效应，具有实用价值。

参 考 文 献

朱惠刚等　1984　水源水及自来水致突变性研究。中国环境科学　4（4）：71—75。

刘明韬等　1983　饮酒所致铅中毒患者外周血淋巴细胞染色体畸变分析。中华预防医学杂志　第17卷。

刘爱华等　1985　鱼类血细胞的微核测定。动物学研究　6（1）：115—116。

苏德隆　1980　饮水与肝癌。中华预防医学杂志　14（2）：65。

贺维顺等　1982　七种农药诱发赤麂（*M. muntjak*）离体细胞染色体畸变，姐妹染色单体交换和细胞周期动力学变化的效应。动物学研究　3（2）：129—136。

贺维顺等　1983　氯化钠和氯乙酰胺对培养赤麂（*Muntjacus muntjak*）细胞姐妹染色单体互换（SCE）和染色体畸变的影响。环境科学学报　3（2）：94—100。

贺维顺等　1987　一种水质污染生物监测的新方法—蝌蚪肠细胞染色体畸变分析。环境科学学报　7（4）：467—471。

Buckley, J. A. 1977 Heinz Body hemolytic anemia in Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*) exposed to chlorinated wastewater. *J. FISH. RES. BOARD. ACN.*, Vol. 34 : 215—224.

Das, R. K. *et al.* 1986 Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of fish heteropneustes fossilis by mitomycin C and paper mill effluent. *Mutat. Res.* 175 : 67—71.

Hooftman, R. N. *et al.* 1982 Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. *Mutat. Res.* 104 : 147—152.

Jaylet, A. *et al.* 1986 A new micronucleus test using peripheral blood erythrocytes of the newt *Pleurodeles waltl* to detect mutagens in fresh-water pollution. *Mutat. Res.* 164 : 245—257.

Katsuhiko, N. *et al.* 1981 Comparative studies of chromosomal aberration induced by trivalent and pentavalent. arsenic *Mutat. Res.* 88 (1) : 73—80.

Leonard, A, *et al.* 1980 Carcinogenicity, teratogenicity and mutagenicity of arsenic. *Mutat. Res.* 75 (1) : 49—62.

Léonard, A. 1980 Carcinogenicity and mutagenicity of chromium. *Mutat. Res.* 76(3) : 227—239

Nakamuro, K. *et al.* 1978 Comparative studies of chromosomal aberration and mutagenicity of trivalent and hexavalent chromium. *Mutat. Res.* 58 : 175—181.

Sandberg, A. A. 1982 Sister chromatid exchange Progress and topics in cytogenetics Vol. 2 : 47—63.

Wild, D. 1979 Cytogenetic effects in the mouse of 17 chemical mutagens and carcinogens evaluated by the micronucleus test, *Mutat. Res.* 56 : 319—327.

DETECTION OF WATER POLLUTION BY MICRONUCLEI AND OTHER NUCLEAR ANOMALIES OF ERYTHROCYTES OF TADPOIES (*BUFO BUFO ANDREWSI*)

He Weishun Wang Ruifang

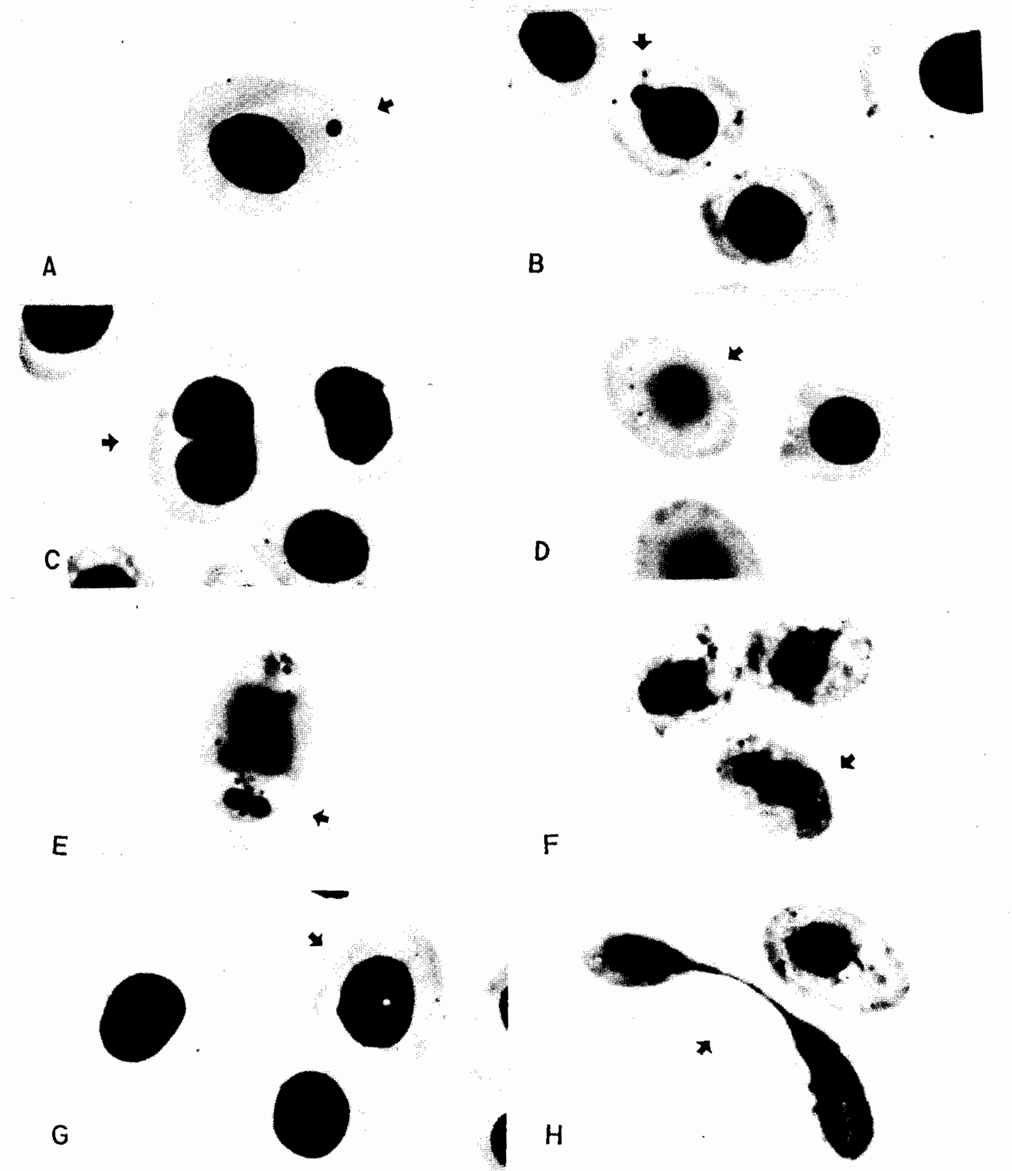
(Laboratory of Animal Genetics and Evolution, Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica)

These studies present a approach to analysis of micronuclei (MN) and other nuclear anomalies (ONA) in erythrocytes of toad (*Bufo bufo andrewsi*) tadpoles, induced by exposure to polluted water of Daguan River. Tadpoles were exposed to polluted water of three different concentration (33.3% 50.0% and 100.0%) for 7 days. In the control, total frequency of nuclear anomalies (including micronuclei) was 4.1‰; Total frequencies of ONA for the above mentioned experiment groups were 8.1‰, 10.8‰ and 15.8‰ respectively. The frequencies of MN and ONA in erythrocytes of tadpole, in various groups, showed distinct dose dependent increases. Our results shown that MN and ONA in erythrocytes of toad tadpole is useful index for detecting genotoxic compounds in the aquatic environment.

Key words: Water pollution, Tadpole, Micronucleus, Nuclear anomaly

图版Ⅰ.贺维顺等：蝌蚪（*Bufo bufo andrewsi*）血红细胞微核和核异常监测水质污染的研究

He weishun, *et al.*: Detection of water Pollution by micronuclei and other nuclear anomalies of erythrocytes of tadpoles *(Bufo bufo andrewsi)*

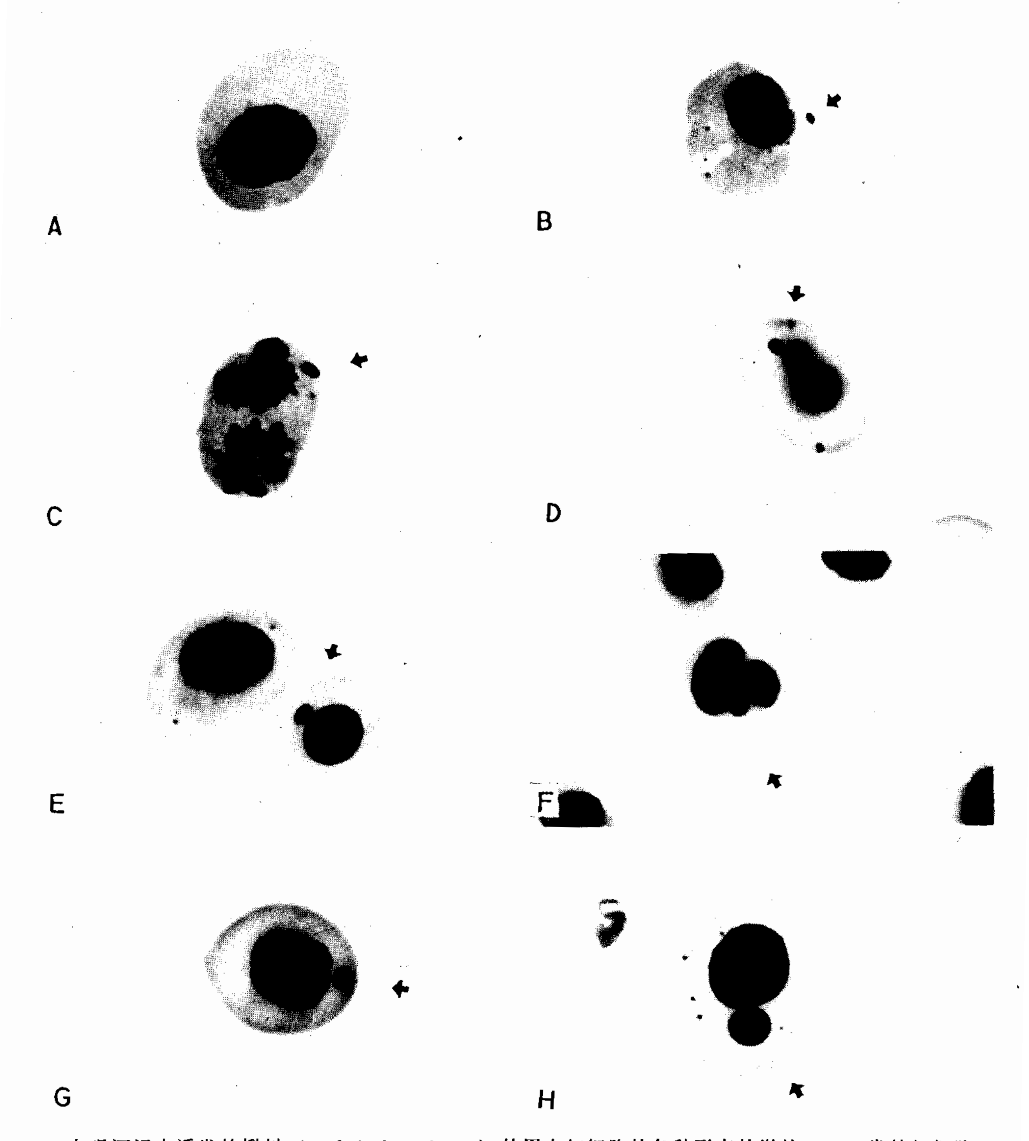


大观河污水诱发的蝌蚪外周血红细胞的微核和核异常：A.微核；B.核质外凸；C.核内凹；D.核固缩；E.核碎裂；F.核变形；G.核空泡；H.无丝分裂.

Micronuclei and other nuclear anomalies in peripheral blood erythrocyte of tadpole (*Bufo bufo andrewsi*), induced by exposure to polluted water of Daguan River. A. Micronucleus; B.Nuclear protrusion; C.Nuclear concavity; D. Karyopyknosis; E, Karyorrhexis; F, Irregular nucleus; G. Nuclear vacuole; H. Amitosis

图版Ⅱ.贺维顺等：蝌蚪（*Bufo bufo andrewsi*）血红细胞微核和核异常监测水质污染的研究

He weishun, *et al.*: Detection of water Pollution by micronuclei and other nuclear anomalies of erythrocytes of tadpoles (*Bufo bufo andrewsi*)



大观河污水诱发的蝌蚪（*Bufo bufo andrewsi*）外周血红细胞的各种形态的微核：A.正常的红细胞；B.红细胞的胞外微核；C.正在分裂的细胞的微核；D.双微核；E—H.各种形态的微核.

Various micronucleus in peripheral blood cells of tadpole (*Bufo bufo andrewsi*), induced by exposure to pol luted water of Daguan River. A.Normal erythrocyte; B. Outboard micronucleus of erythrocyte; C. Micronucleus in dividing mitotic cell; D. Double micronucleus; E—H. Various micronucleus.